

IN THE UNITED STATES PATENT AND TRADEMARK OFFICE

In re the Application of

Hiromichi MORIKAWA et al.

Application No.: 10/058,068

Filed: January 29, 2002



Group Art Unit: 1638

Docket No.: 111818

For: CULTURED CELLS OF FICUS STIPULATA THUNB. (=FICUS THUNBERGII)
AND A METHOD FOR CULTURING TISSUES OF THE FICUS STIPULATA
THUNB. BY USING SAID CULTURED CELLS

CLAIM FOR PRIORITY

Director of the U.S. Patent and Trademark Office
Washington, D.C. 20231

Sir:

The benefit of the filing date of the following prior foreign application filed in the following foreign country is hereby requested for the above-identified patent application and the priority provided in 35 U.S.C. §119 is hereby claimed:

Japanese Patent Application No. 2001-029640 filed February 6, 2001

In support of this claim, a certified copy of said original foreign application:

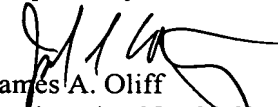
 X is filed herewith.

 was filed on in Parent Application No. filed .

 will be filed at a later date.

It is requested that the file of this application be marked to indicate that the requirements of 35 U.S.C. §119 have been fulfilled and that the Patent and Trademark Office kindly acknowledge receipt of this document.

Respectfully submitted,


James A. Oliff
Registration No. 27,975

Joel S. Armstrong
Registration No. 36,430

JAO:JSA/mlb
Date: May 10, 2002

OLIFF & BERRIDGE, PLC
P.O. Box 19928
Alexandria, Virginia 22320
Telephone: (703) 836-6400

DEPOSIT ACCOUNT USE
AUTHORIZATION
Please grant any extension
necessary for entry;
Charge any fee due to our
Deposit Account No. 15-0461



日 本 国 特 許 庁
JAPAN PATENT OFFICE

別紙添付の書類に記載されている事項は下記の出願書類に記載されている事項と同一であることを証明する。

This is to certify that the annexed is a true copy of the following application as filed with this Office

出 願 年 月 日

Date of Application:

2001年 2月 6日

出 願 番 号

Application Number:

特願2001-029640

[ST.10/C]:

[JP2001-029640]

出 願 人

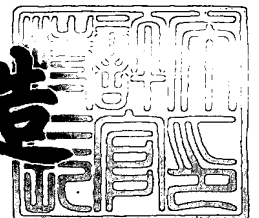
Applicant(s):

広島大学長

2002年 2月22日

特許庁長官
Commissioner,
Japan Patent Office

及 川 耕 造



出証番号 出証特2002-3009374

【書類名】 特許願

【整理番号】 U2000P143

【提出日】 平成13年 2月 6日

【あて先】 特許庁長官 及川 耕造 殿

【国際特許分類】 C12N 5/00

【発明の名称】 ヒメイタビの培養細胞及び該培養細胞を用いた組織培養
法

【請求項の数】 7

【発明者】

【住所又は居所】 広島県東広島市鏡山1丁目3番2号 広島大学大学院理
学研究科内

【氏名】 森川 弘道

【発明者】

【住所又は居所】 広島県東広島市鏡山1丁目3番2号 広島大学大学院理
学研究科内

【氏名】 高橋 美佐

【特許出願人】

【識別番号】 391012648

【氏名又は名称】 広島大学長 原田 康夫

【代理人】

【識別番号】 100072051

【弁理士】

【氏名又は名称】 杉村 興作

【選任した代理人】

【識別番号】 100059258

【弁理士】

【氏名又は名称】 杉村 暁秀

【提出物件の目録】

【物件名】 明細書 1

【物件名】 要約書 1

【包括委任状番号】 9709711

【書類名】 明細書

【発明の名称】 ヒメイタビの培養細胞及び該培養細胞を用いた組織培養法

【特許請求の範囲】

【請求項1】 ヒメイタビの組織の一部を、ヒメイタビのカルス化を誘導するために有効的な量のチジアズロン又はベンジルアデニンの少なくとも1種を含む培地で培養して得た、未分化能を有するヒメイタビの培養細胞。

【請求項2】 ヒメイタビの組織が、茎頂、茎、葉、胚細胞及び根からなる群から選択される少なくとも1種であることを特徴とする請求項1記載の培養細胞。

【請求項3】 ヒメイタビの組織が、ヒメイタビを無菌的に挿し木して発根させた植物体由来の組織である請求項1又は2項に記載の培養細胞。

【請求項4】 ヒメイタビの組織が、前記挿し木後6週間未満の組織である請求項3記載の培養細胞。

【請求項5】 前記培地が、WP培地又はMS培地である請求項1～4項のいずれか1項に記載の培養細胞。

【請求項6】 請求項1～5項のいずれか1項に記載の培養細胞を、ヒメイタビのカルス化を誘導するために有効的な量のチジアズロン又はベンジルアデニンの少なくとも1種を含む培地で継代培養して、ヒメイタビの小植物体を得ることを特徴とするヒメイタビの組織培養法。

【請求項7】 培地が、WP培地又はMS培地であることを特徴とする請求項6記載の方法。

【発明の詳細な説明】

【0001】

【発明の属する技術分野】

本発明は、培養細胞及び組織培養法に関し、特にヒメイタビの培養細胞及び当該培養細胞を利用したヒメイタビの組織培養法に関する。

【0002】

【従来の技術】

近年高等植物の組織培養研究が盛んになり、葉、茎、根などから取り出した植物組織を大量に培養する技術が注目されている。切り取った植物片を栄養分を含

んだ寒天や液体の培地に置くと、切り口から細胞の集団がもり上がってくる。これをカルスと呼ぶ。

【0003】

一般に異なる組織の細胞、例えば、根と葉の組織は、互いに形も機能も違っている。これは細胞が成長する段階で次第に分化していった結果である。しかし、カルスは、不定形、未分化のまま成長を続ける。

【0004】

一般に植物を増やすには種子を蒔いたり、挿し木をしたりしなければならない。またその育成には土壌や環境などが大きく影響する。しかしカルスの培養は、そのような変化に左右されない。さらに、カルスは通常の植物体よりも速く成長する。カルスに発芽や発根を促がすホルモンや化学物質を加えると、完全な植物体となる。

【0005】

このようなカルスの組織培養法としては、ポプラやユーカリなどの樹木の組織培養法が知られている。

【0006】

【発明が解決しようとする課題】

しかしながら、組織培養法として確立されているのは、ポプラやユーカリなどの樹種に限られていた。これは、その他の品種は、適切なホルモン等を使用しなければ、発育、又は発根させることが困難であることが理由の1つである。

【0007】

ところで、近年、窒素酸化物や硫黄酸化物、揮発性有機炭化水素などによる環境汚染が進み、植物や動物、ヒトへの悪影響が懸念されている。また、ヒートアイランドや大気汚染に対する植物の効果が認識され、都会では、ビルの屋上や壁面を緑化する壁面緑化が考案されている。特に、蔓性植物は、ビルの壁面や屋上などを足場として生育できる点で都市部の緑化に適している。したがって、このような蔓性植物を効率よく増殖させることができれば、都市部の緑化に迅速に対応することができる。

【0008】

蔓性植物の中で、ヒメイタビは、クワ科イチジク属に属する植物であり、街路樹の1種である。ヒメイタビは、気根を壁面におろし壁面つたいに成育し、また、葉が長さ1~2cmと小さいため壁面緑化に適した蔓性植物である。このような蔓性植物を確実に、かつ、迅速に供給するには、組織培養法が効果的である。しかし、ヒメイタビの安定した大量増殖法は、これまで確立されていない。

【0009】

そこで、本発明は、ヒメイタビの安定した大量増殖、形質転換系を確立する培養細胞及び組織培養法を提供することにある。

【0010】

【課題を解決するための手段】

上記目的を達成するために、発明者らは、ヒメイタビのカルス化、再分化を誘導するのに適した条件について鋭意研究を積み重ねた結果、本発明の培養細胞及び組織培養法を見出すに至った。

【0011】

本発明の未分化能を有する培養細胞は、ヒメイタビの組織の一部を、ヒメイタビのカルス化を誘導するために有効的な量のチジアズロン又はベンジルアデニンの少なくとも1種を含む培地で培養して得たことを特徴とする。

【0012】

また、本発明のヒメイタビの培養細胞の好ましい実施態様としては、ヒメイタビの組織が、茎頂、茎、葉、胚細胞及び根からなる群から選択されることを特徴とする。

【0013】

また、本発明のヒメイタビの培養細胞の好ましい実施態様としては、ヒメイタビの組織が、ヒメイタビの組織が、ヒメイタビを無菌的に挿し木して発根させた植物体由来の組織であることを特徴とする。

【0014】

また、ヒメイタビの組織が、前記挿し木後6週間未満の組織であることを特徴とする

【0015】

また、本発明のヒメイタビの培養細胞の好ましい実施態様としては、前記培地が、WP培地又はMS培地であることを特徴とする。

【0016】

また、本発明のヒメイタビの組織培養法の好ましい実施態様としては、請求項1～5項のいずれか1項に記載のヒメイタビの培養細胞を、ヒメイタビのカルス化を誘導するために有効的な量のチジアズロン又はベンジルアデニンの少なくとも1種を含む培地で継代培養して、ヒメイタビの小植物体を得ることを特徴とする。

【0017】

また、本発明のヒメイタビの組織培養法の好ましい実施態様としては、培地が、WP培地又はMS培地であることを特徴とする。

【0018】

【発明の実施の形態】

本発明の培養細胞は、ヒメイタビの組織の一部を、ヒメイタビのカルス化を誘導するために有効的な量のチジアズロン又はベンジルアデニンの少なくとも1種を含む培地で培養して得た、未分化能を有するヒメイタビの培養細胞である。

【0019】

組織培養法における小植物体の形成過程としては、一般に、①カルスの発生、②カルスから多芽体の形成、③多芽体の再分化、④小植物体の形成、を経る。ヒメイタビの組織培養においてもこの形成過程をとる。ここで、多芽体とは、シュート(芽)が多数集まったものであり、細胞は分化している状態のものを意味する。以下、本発明のヒメイタビの培養細胞、及び組織培養法について説明する。

【0020】

ヒメイタビの組織としては、特に限定されないが、茎、葉、根、茎頂、根端、及び胚細胞などの組織を挙げることができる。好ましくは、茎頂、茎、葉、胚細胞、及び根である。

【0021】

また、ヒメイタビの組織は、成熟したヒメイタビ樹木から採取したもののでも良いが、好ましくは、ヒメイタビを無菌的に挿し木して発根させた植物体由来の組

織である。挿し木の無菌処理としては、特に限定されないが、例えば、エタノール等で数時間、次亜鉛素酸ナトリウムで数時間処理した後、滅菌水で洗浄して行うことができる。

【0022】

挿し木は、茎頂を含む先端約2cmの部分を切り出したものを用いることができる。また、ヒメイタビの組織は、このように挿し木した後、4～6週間未満の組織が好ましい。

【0023】

本発明の培養細胞は、上述の組織の一部を、ヒメイタビのカルス化を誘導するために有効な量のチジアズロン又はベンジルアデニンの少なくとも1種を含む培地で培養して得ることができる。チジアズロンの量は、用いる培地、培養条件にもよるが、好ましくは、 $1\sim 10^4$ nMである。かかる範囲としたのは、再分化率を高めるためである。ベンジルアデニンの量は、使用する培地、培養条件にもよるが、好ましくは、 $1\sim 100$ nMである。より好ましくは、 $1\sim 50$ nMである。かかる範囲としたのは、再分化率を高めるためである。

【0024】

培地としては、例えば、WP培地、MS培地、ホワイト (White) 培地及びこれらの修正培地のような培地をあげることができる。WP培地は、ツツジ科のアメリカシャクナゲ (*Kalmia latiflora*) の茎張培養・大量培養用に、MS培地から改良されたものである。MS培地は、タバコの髄組織、及びカルスの増殖を指標にして開発された培地である。ヒメイタビの培養には、カルス形成率、及び再分化率を高めるという観点から、好ましくは、WP培地である。

【0025】

この他、培地には、通常の培養に用いられる微量有機物、炭素源等を含むことができる。微量有機物としては、ビタミンB1、B6、ニコチン酸、チアミン塩酸塩、ピリドキシン塩酸塩、ニコチン酸等のビタミン類；グリシン、アスパラギン等のアミノ酸；イノシット、ソルビット等の6価アルコールを挙げることができる。

【0026】

炭素源としては、シュクロース、グルコース等の糖類を挙げることができる。

培地に植えられた組織片の培養は、20～30度の温度条件、明所下又は暗所下で行うことができる。温度条件は、好ましくは、22～28度である。培養後、約1週間目頃からカルス化が起り、約2週間後には、完全にカルス化が生じる。得られたカルスは、下記に示す培地上で、約10～20日間の継代間隔で継代すると安定なカルスが得られる。

【0027】

本発明の組織培養法によれば、未分化能を有するヒメイタビの培養細胞を、チジアズロン(TDZ)又はベンジルアデニン(BA)の少なくとも1種を含む培地で継代培養して、ヒメイタビの小植物体を得ることができる。チジアズロン(TDZ)及びベンジルアデニン(BA)の量については、上述の培養細胞の培養に用いる条件を適用することができる。

【0028】

なお、未分化能を有するヒメイタビの培養細胞として、上述した本発明の培養細胞を用いることができる。

【0029】

多芽体を切り取り、切り口に、例えばインドール酢酸を練ることによって、小植物体の成長を促すことができる。

【0030】

また、培地の支持体としては、パーライト、バーミキュライト、ゲランガム、寒天、アガロース等を挙げることができる。

【0031】

【実施例】

以下、本発明を実施例により更に具体的に説明するが、本発明は、下記実施例に限定して解釈される意図ではない。

【0032】

実施例1

基本培地としてMS培地あるいはWP培地を、炭素源として1%シュクロース、

ゲル化剤として0.3%ゲランガムを加えた培地を用いた。

【0033】

無菌培養したヒメイタビの葉、茎、根組織を用いて、0.5～1mmの切片を調整した。調整したヒメイタビの葉、茎、根の切片を植物ホルモンであるチジアズロンとベンジルアデニンを含む培地上に置床し、ヒメイタビを培養した。培養1ヵ月後に切片から多芽体の形成が観察された。多芽体を切り取り、切り口にインドール酢酸を塗り、前記培地、あるいはパーライト及びバーミキュライトを含む培地に挿し、発根させた。表1に、多芽体の形成が観察された切片の割合、及びシュート数/切片を示す。

【0034】

【表1】

BA (nM)	TDZ (nM)	多芽体の形成が観察された 切片数×100/切片	シュート数/切片
0	0	100	1.5±1.0
0	1	100	1.5±1.0
0	1×10 ²	100	2.5±0.6
0	1×10 ⁴	100	1.5±1.0
9	0	50	1.8±2.4
9	1	100	2.5±0.6
9	1×10 ²	100	2.5±1.0
9	1×10 ⁴	75	1.5±1.3
22	0	100	3.5±0.6
22	1	100	3.0±1.4
22	1×10 ²	100	4.3±1.9
22	1×10 ⁴	75	2.5±1.7
36	0	100	2.5±1.0
36	1	100	3.8±1.3
36	1×10 ²	100	3.5±1.3
36	1×10 ⁴	100	2.3±1.0
44	0	100	3.8±0.5
44	1	100	4.0±1.2
44	1×10 ²	75	2.0±1.4
44	1×10 ⁴	100	2.8±1.3

【0035】

表1から明らかなように、チジアズロン(TDZ)又はベンジルアデニン(BA)の少なくとも1種を含む培地において培養した場合、高い確率でヒメイタビのカルス化

を誘導することができ、さらに、継代培養することにより、高い確率でヒメイタビの再分化を誘導できることが判明した。

【0036】

実施例2

ヒメイタビにおける遺伝子の導入に最も適した再分化条件を検討し、遺伝子導入を試みた。

【0037】

まず、再分化条件について検討した。ヒメイタビは、滅菌し、無菌的に植え継いでいるものを用いた。無菌的に生育させたヒメイタビ(挿し木後4~6週間)を用いて茎先端、節、茎部分の切片を作成して培地に置床し、6週間後に芽の数・形態を観察した。ヒメイタビを培養するに当たり、試験管(30×200mm)内にフロリアライト552.を三分の一ブロックを加え、さらにMS培地又はWP培地15mlを加え、ポリプロピレンキャップをし、オートクレープしたものを準備した。

【0038】

ヒメイタビをアグリポット内で無菌的に植え継いでいるものに現れた新芽を約2~3cm切り取り、切断面を1g/L 4-(3-インドリル)酪酸に浸し、上述のように準備した試験管中に置床し、4~8週間培養した。

【0039】

培養条件としては、気温25℃、照度 $30\sim40\mu\text{Em}^{-2}\text{s}^{-1}$ 、明条件($30\sim40\mu\text{Em}^{-2}\text{s}^{-1}$)下で15時間、暗条件($1\sim2\mu\text{Em}^{-2}\text{s}^{-1}$)下で9時間であった。

また、基本培地として、MS培地又はWP培地を用いた。両方の培地には、シュウクロース2%を加えた。培地のpHは、MS培地については5.6、WP培地については5.2に調整した。さらに、培地にGellan Gum 0.3%を加え、120℃にて15分間オートクレープし、固形培地として調整した。植物ホルモンとしてナフタレン酢酸(NAA)、ベンジルアミノプリン(BA)、チジアズロン(TDZ)、アブシジン酸(ABA)、硝酸銀(AgNO_3)を用いた。

【0040】

その結果、植物ホルモンとしては、BA、TDZを用いたもの、光条件としては、明条件のもの、培地としては、WP培地のものが良好な再分化状態を示した。

表2に、BA又はTDZを用いた場合、多芽体形成数、形成された芽の数を示す。

【0041】

【表2】

BA (nM)	TDZ (nM)	総切片数	茎先端 多芽体形 成切片数	形成した芽の数
0	0	4	4	1.5±1.0
0	1	4	4	1.5±1.0
0	10 ²	4	4	2.5±0.6
0	10 ⁴	4	4	1.5±1.0
8.9	0	4	2	1.8±2.4
8.9	1	4	4	2.5±0.6
8.9	10 ²	4	4	2.5±1.0
8.9	10 ⁴	4	3	1.5±1.3
22.2	0	4	4	3.5±0.6
22.2	1	4	4	3.0±1.4
22.2	10 ²	4	4	4.3±1.9
22.2	10 ⁴	4	3	2.5±1.7
35.5	0	4	4	2.5±1.0
35.5	1	4	4	3.8±1.3
35.5	10 ²	4	4	3.5±1.3
35.5	10 ⁴	4	4	2.3±1.0
44.4	0	4	4	3.8±0.5
44.4	1	4	4	4.0±1.2
44.4	10 ²	4	3	2.0±1.4
44.4	10 ⁴	4	4	2.8±1.3

【0042】

実施例3

次に、ヒメイタビの形質転換体の作製を試みた。遺伝子の導入には、パーティクルガン法を用いた。まず、パーティクルガンを用いて、植物の高効率遺伝子発現カセットにGFP(Green Fluorescence Protein)遺伝子を組み込んだ発現ベクターpTH-2を導入した。植物材料としては、上述した多芽体を形成する培養条件で、3～14日間培養した外植片を用いた。遺伝子導入2日後には、GFPシグナルが多数認められた。これにより、GEP遺伝子がヒメイタビに正確に導入されたことを確認した。

【0043】

【発明の効果】

本発明の培養細胞によれば、ヒメイタビの形質転換に利用することが可能であるという有利な効果を奏する。

【 0 0 4 4 】

また、本発明の組織培養法によれば、ヒメイタビの大量増殖が可能であり、壁面緑化の材料として利用され得るという有利な効果を奏する。

【書類名】 要約書

【要約】

【課題】 ヒメイタビの安定した大量増殖、形質転換系を確立する培養細胞及び組織培養法を提供することにある。

【解決手段】 ヒメイタビの組織の一部を、ヒメイタイビのカルス化を誘導するために有効的な量のチジアズロン又はベンジルアデニンの少なくとも1種を含む培地で培養して得た、未分化能を有するヒメイタビの培養細胞。

【選択図】 なし

認定・付加情報

特許出願の番号	特願2001-029640
受付番号	50100165121
書類名	特許願
担当官	第五担当上席 0094
作成日	平成13年 2月 7日

<認定情報・付加情報>

【特許出願人】

【識別番号】	391012648
【住所又は居所】	広島県東広島市鏡山1丁目3番2号
【氏名又は名称】	広島大学長

【代理人】 申請人

【識別番号】	100072051
【住所又は居所】	東京都千代田区霞が関3-2-4 霞山ビル7階
【氏名又は名称】	杉村 興作

【選任した代理人】

【識別番号】	100059258
【住所又は居所】	東京都千代田区霞が関3-2-4 霞山ビル7階
【氏名又は名称】	杉村 暁秀

【書類名】 手続補正書
【提出日】 平成14年 1月25日
【あて先】 特許庁長官 及川 耕造 殿
【事件の表示】

【出願番号】 特願2001- 29640
【補正をする者】
【識別番号】 391012648
【氏名又は名称】 広島大学長 原田 康夫

【代理人】
【識別番号】 100072051
【弁理士】

【氏名又は名称】 杉村 興作

【手続補正 1】

【補正対象書類名】 特許願
【補正対象項目名】 発明者
【補正方法】 変更

【補正の内容】

【発明者】

【住所又は居所】 広島県東広島市鏡山1丁目3番1号 広島大学大学院理学研究科内

【氏名】 森川 弘道

【発明者】

【住所又は居所】 広島県東広島市鏡山1丁目3番1号 広島大学大学院理学研究科内

【氏名】 高橋 美佐

【その他】 発明者の住所の誤記を補正しました。これはタイプミスによるものです。

【プルーフの要否】 要

認定・付加情報

特許出願の番号	特願2001-029640
受付番号	50200094825
書類名	手続補正書
担当官	佐々木 吉正 2424
作成日	平成14年 1月30日

<認定情報・付加情報>

【補正をする者】

【識別番号】	391012648
【住所又は居所】	広島県東広島市鏡山1丁目3番2号
【氏名又は名称】	広島大学長

【代理人】 申請人

【識別番号】	100072051
【住所又は居所】	東京都千代田区霞が関3-2-4 霞山ビル7階
【氏名又は名称】	杉村 興作

出 願 人 履 歴 情 報

識別番号 [391012648]

1. 変更年月日 1997年 5月14日
[変更理由] 住所変更
住 所 広島県東広島市鏡山1丁目3番2号
氏 名 広島大学長
